

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

Anmeldenummer: 88121675.8

Int. Cl. C12N 15/00, C12P 21/00

Anmeldetag: 24.12.88

Priorität: 31.12.87 DE 3744595

Veröffentlichungstag der Anmeldung:
19.07.89 Patentblatt 89/29

Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE

Anmelder: Plückthun, Andreas, Dr.
Veit-Lung-Strasse 6
D-8033 Planegg(DE)

Anmelder: Skerra, Arne
Cheruserweg 6
D-6200 Wiesbaden(DE)

Erfinder: Plückthun, Andreas, Dr.
Veit-Lung-Strasse 6
D-8033 Planegg(DE)
Erfinder: Skerra, Arne
Cheruserweg 6
D-6200 Wiesbaden(DE)

Vertreter: Klein, Otto, Dr. et al
Hoechst AG Zentrale Patentabteilung
Postfach 80 03 20
D-6230 Frankfurt am Main 80(DE)

Verfahren zur gentechnischen Herstellung von Antikörpern.

Verfahren zur gentechnischen Herstellung von Antikörpern Funktionelle Antikörperfragmente kann man in Bakterien herstellen, wenn man die Gene für die einzelnen Ketten an je eine Signalsequenz koppelt, die den Transport der Präpeptide durch die cytoplasmatische Membran bewirken, die Genstrukturen in einem Bakterium zur Expression bringt und das funktionelle Protein aus dem periplasmatischen Raum oder dem Medium isoliert. Vorteilhaft isoliert man das funktionelle Protein durch Affinitätschromatografie an ein Adsorbens, das mit dem Hapten oder Antigen beladen ist, und Elution mit einer Lösung des Haptens oder Antigens.

EP 0 324 162 A1

Verfahren zur gentechnischen Herstellung von Antikörpern

Die Expression von Antikörpern in Hefe wurde beschrieben (C.R. Wood, M.A. Boss, J.H. Kenten, J.E. Calvert, N.A. Roberts and J.S. Emtage, Nature 314, 446 (1985)), aber nur ein sehr kleiner Anteil des exprimierten Proteins erwies sich als funktionell. In *E. coli* konnten bisher Antikörper-Proteine nur in denaturierter Form erhalten werden (M.A. Boss, J.H. Kenten, C.R. Wood and J.S. Emtage, Nucleic Acids Res. 12, 3791 (1984); S. Cabilly, A.D. Riggs, H. Pande, J.E. Shively, W. E. Holmes, M. Rey, L. J. Perry, R. Wetzel and H.L. Heyneker, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81, 3273 (1984)). Die Reinigung aktiver Antikörper oder Antikörperfragmente aus Hefe oder anderen Mikroorganismen ist noch nicht bekannt. Proteinfaltungsversuche haben bisher nur zu einem geringen Prozentsatz richtig gefalteter rekombinanter Antikörper Proteine geführt. Außerdem ist es schwierig, die gewünschten funktionellen Proteine von unerwünschten und nicht funktionellen Proteinen abzutrennen, was die genaue Messung von Bindungskonstanten, Ausbeuten bei der Faltung, spektralen Eigenschaften und dergleichen und die Anwendung in Therapie und Technik erschwert. Die Optimierung der Faltungsbedingungen ist deshalb außerordentlich schwierig, zumal es keine bewährten Verfahren und Meßmethoden für die Rückfaltung gibt.

Die Expression funktionaler kompletter Antikörper oder funktioneller Bindungsdomänen von Antikörpern in bakteriellen Expressionssystemen ist bisher nicht bekannt und die Aussichten zu ihrer Verwirklichung wurden pessimistisch beurteilt (S.L. Morrison, Science 229, 1202 (1985), M.A. Boss and C.R. Wood, Immunol. Today 6, 12 (1985)).

Ein solches System wäre sehr wünschenswert, da die gentechnischen Verfahren insbesondere für *E. coli* gut ausgearbeitet sind und aufgrund des schnellen Wachstums die Massenproduktion erleichtert ist, was ökonomisch von erheblicher Bedeutung ist.

Die Erfindung bezieht sich deshalb auf die Herstellung von funktionsfähigen Antikörpern, deren funktionelle Fragmente oder von Fusionsproteinen aus Antikörperdomänen und anderen Proteinen in Bakterien, vorzugsweise Gram-negativen Bakterien, insbesondere in *E. coli*. Das erfindungsgemäße Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, daß man die Gene für die einzelnen Ketten des Antikörpermoleküls oder -fragments je an eine Signalsequenz koppelt, die den Transport der Polypeptidketten durch die cytoplasmatische Membran bewirkt und abgespalten werden kann, die Genstrukturen zur Expression bringt und das funktionelle Protein aus dem periplasmatischen Raum oder dem Medium isoliert. Bevorzugte Ausgestaltungen dieser Erfindung werden im folgenden näher erläutert bzw. in den Patentansprüchen definiert.

Die Koppelung der Gene für die einzelnen mit Signal-Sequenzen versehen Ketten erfolgt vorteilhaft in der Art eines regulierbaren Operon-Systems, das die gleichzeitige Expression durch eine gemeinsame Steuerungsregion bewirkt. Auf diese Weise werden die einzelnen Proteinketten im angenähert stöchiometrischen Verhältnis gemeinsam exprimiert und in den periplasmatischen Raum transportiert, wo die Verbindung zum funktionellen Molekül erfolgt. Der Transport von Proteinen aus dem Cytoplasma erfolgt nach an sich bekannten Methoden, wie sie beispielsweise in der EP-B 0 006 694 beschrieben sind.

Als Steuerungsregion kommt jede geeignete regulierbare Genregulationsregion in Betracht, beispielsweise *lac*, *tac*, *trp* oder synthetische Sequenzen. Besonders bevorzugt sind Regulationsregionen, die zuverlässig abschaltbar sind.

Die Isolierung der Proteine aus dem periplasmatischen Raum erfolgt vorteilhaft dadurch, daß man auf die abgemerten Zellen einen milden osmotischen Schock ausübt und die hierbei erhaltene flüssige Phase durch Ultrafiltration oder Fällung, beispielsweise mit Salzen wie Ammoniumsulfat, aufkonzentriert.

Ein "milder" osmotischer Schock bewirkt das Austreten des Periplasmas, wobei aber die cytoplasmatische Membran intakt bleibt.

Das Proteinkonzentrat wird zweckmäßig nach einer Dialyse auf ein Adsorbens, vorteilhaft in Form einer Affinitätsäule, gegeben, das mit dem entsprechenden Antigen oder Hapten beladen ist. Durch geeignete Elution, vorteilhaft mit dem Antigen oder Hapten, erhält man dann den Antikörper bzw. das funktionelle Antikörperfragment.

In der eukaryotischen Zelle werden Antikörper im Lumen des endoplasmatischen Retikulums - wahrscheinlich unter Mitwirkung von Disulfid-isomerasen, Prolin-cis-trans-Isomerasen und möglicherweise weiteren Enzymen oder Proteinen - gebildet. Es war überraschend, daß auch die Bakterienzelle in der Lage ist, die beiden Ketten in der etwa gleichen stöchiometrischen Menge herzustellen, beide Vorläuferproteine in den periplasmatischen Raum oder das sie umgebende Medium zu transportieren, die Signalsequenzen korrekt abzuspalten, die globulären und löslichen Domänen korrekt zu falten, die intramolekularen Disulfidbindungen zu bilden und beide Ketten zu einem Heterodimer zu assoziieren, da es als unwahrscheinlich gilt, daß die Bakterienzelle über solche oder gleichwirkende Enzyme verfügt. Es zeigte sich also überraschenderweise, daß im Falle Gram-negativer Bakterien das bakterielle Periplasma dem Lumen des eukaryo-

lischen endoplasmatischen Retikulums in dieser Beziehung funktionell äquivalent ist.

Das erfindungsgemäße Verfahren hat eine Reihe von Vorteilen:

Abgesehen von der schon erwähnten leichten und billigen bakteriellen Massenfermentation werden unmittelbar funktionelle Proteine gebildet, wodurch also die Spaltung von Fusionsproteinen mit nachfolgender Isolierung des gewünschten Proteins oder Protein-Fragments, dessen Oxidation oder in-vitro-Rückfaltung vermieden werden.

Beim erfindungsgemäßen Verfahren wurden auch keine Probleme mit zellulären Proteasen festgestellt. Bekanntlich werden ja wegen dieser zellulären Proteasen Proteine in Bakterien üblicherweise in der Form von Fusionsproteinen, insbesondere als unlösliche Einschlusskörper, exprimiert, was aber die genannten aufwendigen Weiterverarbeitungsschritte mit sich bringt. Demgegenüber ist die Abtrennung und Reinigung bis zur Homogenität beim erfindungsgemäßen Verfahren schnell und einfach.

Die Erfindung erlaubt also einen leichten Zugang zu Antikörpern, ihren funktionellen Fragmenten und abgewandelten Antikörpern, die sich durch Einfügung, Eliminierung und/oder Austausch von Aminosäuren von den nativen Antikörpern unterscheiden. So kann man beispielsweise Cysteine eliminieren oder durch andere Aminosäuren ersetzen, um eine unerwünschte Faltung zu unterdrücken. Genauso kann man einen murinen Antikörper in einen humanen überführen, oder andere Mutationen einführen. Neben den pharmakologischen und technischen Anwendungsmöglichkeiten besteht somit ein erleichteter Zugang zur Erforschung der Antikörperstruktur und -funktion und der Grundlagen der enzymatischen Katalyse (V. Raso and B.D. Stollar, *Biochemistry* 14, 584 (1975); V. Raso and B.D. Stollar, *Biochemistry* 14, 591 (1975); A. Tramontano, K.D. Janda and R.A. Lerner, *Science* 234, 1566 (1986); S.J. Pollack, J.W. Jacobs and P.G. Schultz, *Science* 234, 1570 (1986); J. Jacobs, P.G. Schultz, R. Sugawara and M. Powell, *J. Am. Chem. Soc.* 109, 2174 (1987)).

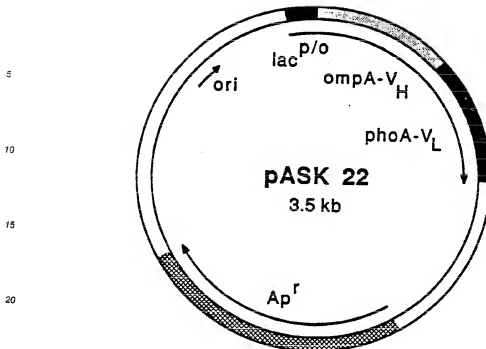
Die Erfindung erlaubt weiterhin die Anwendung von Testsystemen (Assays) unmittelbar auf die bakterielle Zelle, in der der funktionelle Antikörper gebildet wird, und damit eine schnelle Untersuchung auf gegebenenfalls mutierte Antikörper.

Neben den genannten Variationen des Antikörpermoleküls durch Variation einzelner oder weniger Aminosäuren können in das Antikörper-Gen auch andere Genregionen eingefügt oder Teile gegen unkritische Genregionen ausgetauscht werden. Man kann so Markierungsenzyme (M.S. Neuberger, G.T. Williams and R.O. Fox, *Nature* 312, 604 (1984)), Toxine (G. Möller (ed.) "Antibody carriers of drugs and toxins in tumor therapy", *Immunol. Rev.* 62, Munksgaard, Copenhagen (1982)) oder Immunglobulin-Regionen einer anderen Klasse (M.S. Neuberger, G.T. Williams, E.B. Mitchell, S.S. Jouhal, J.G. Flanagan, and T.H. Rabbitts, *Nature* 314, 268 (1985)) oder einer anderen Species (P.T. Jones, P.H. Dear, J. Foote, M.S. Neuberger, and G. Winter, *Nature* 321, 522 (1986)) an das Antikörpermolekül koppeln.

Das erfindungsgemäße Verfahren wird im folgenden am Beispiel der variablen Domänen des Phosphorycholin-bindernden Antikörper-Myelom-Proteins McPC603 erläutert. Die dreidimensionale Struktur dieses Mäuse-Immunglobulin A ist bekannt (D.M. Segal, E. A. Padlan, G.H. Cohen, S. Rudikoff, M. Potter and D.R. Davies, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 71, 4298 (1974)). Eingesetzt wurden synthetische Gene für die variable leichte Kette V_L und schwere Kette V_H . Solche synthetischen Gene sind in der deutschen Offenlegungsschrift 37 15 033 bzw. der EP-A 0 290 005 und der AU-A 15631/88 (dort Tabellen 1 und 2) vorgeschlagen. Eine besonders zweckmäßige Ausgestaltung solcher synthetischen Gene zeigt die Tabelle, in der die DNA-Sequenz des gesamten Expressionsplasmids wiedergegeben ist und die Gene für die beiden Ketten durch die Aminosäureangaben hervorgehoben sind. Bei der Konstruktion dieser DNA-Sequenzen wurden Kodons vermieden, die von E. coli selten verwendet werden. Weiterhin wurden singuläre Restriktionsenzym-Schnittstellen eingebaut und auf die Sekundärstruktur der RNA Rücksicht genommen.

Bei dem als Modell dienenden funktionellen Antikörper-Fragment hat jede Domäne eine intramolekulare Disulfidbrücke (von Cys 23 zu Cys 94 in V_L und von Cys 22 zu Cys 98 in V_H). Es existiert keine Disulfidbrücke zwischen den Ketten und auch keine freies Cystein.

Der eingesetzte Expressionsvektor pASK 22 ist schematisch in der folgenden Formel



wiedergegeben. In ihr sind die synthetischen Gene für die V_L - und die V_H -Domänen an Genfragmente für die bakterielle Signalsequenz des Äußeren Membranproteins A ($ompA$) einerseits und der Alkalischen Phosphatase ($phoA$) andererseits gekoppelt. Die Gene für die beiden Vorläuferproteine sind in einer künstlichen Operon-artigen Struktur hinter dem lac -Promotor angeordnet, wodurch die gleichzeitige Induktion, Koexpression und Kosekretion beider Gene gewährleistet sind.

Nach der Induktion der Genexpression werden die Zellen geerntet und einem milden osmotischen Schock ausgesetzt. Die hierbei erhaltene Flüssigphase, die die periplasmatischen Proteine enthält, wird durch Ultrafiltration konzentriert, dialysiert und direkt auf eine Affinitätsäule aufgetragen, die ein Phosphorycholderivat (B. Chesebro and H. Metzger, *Biochemistry* 11, 766 (1972)) als Affinitätsliganden enthält. Durch Elution mit Phosphorycholin erhält man ein homogenes F_V -Fragment, das gelelektrophoretisch einheitlich ist. Aus dem SDS-Polyacrylamidgel läßt sich ableiten, daß beide Ketten des gereinigten F_V -Fragments in einem Molverhältnis von 1:1 vorhanden sind und die erwarteten Molgewichte der reifen Proteine (V_H : 13600 D, V_L : 12400 D) vorliegen. Zum Nachweis der korrekten Abspaltung beider Signalsequenzen wurden die sechs N-terminalen Aminosäuren beider Ketten sequenziert. Es ergab sich, daß beide Ketten die korrekten N-Termini für die reifen Proteine aufwiesen. Es wurden also beide heterologen Präproteine durch die bakterielle Signalpeptidase richtig gespalten und es ist kein Anhaltspunkt erkennbar, daß eine unpräzise Prozessierung oder eine N-terminale Abbaureaktion erfolgte.

Die Affinitätskonstante des rekombinanten F_V -Fragments von McPC603 wurde durch Gleichgewichtsdialyse gemessen. Hierbei wurden die gleichen Bedingungen verwendet, die bei der Bestimmung der Affinitätskonstante des nativen Antikörpers McPC603, isoliert aus Maus-Aszites, angewandt wurden. Der für das F_V -Fragment gefundene Wert von $1,21 \pm 0,06 \times 10^5 M^{-1}$ ist innerhalb der Experimentiergenauigkeit identisch mit dem für den nativen Antikörper berichteten Wert $1,6 \pm 0,4 \times 10^5 M^{-1}$. Die Bindungskurve nach Scatchard (Ann. N. Y. Acad. Sci. 51, 660 (1949)) ist linear und die Extrapolation zeigt an, daß annähernd 1 Mol Hapten pro Mol F_V -Fragment gebunden sind. Hierdurch wird bestätigt, daß es nur eine Art von Bindungsstellen pro F_V -Fragment gibt und daß in dem isolierten Protein keine inaktiven Bestandteile vorhanden sind.

Es hat sich also überraschenderweise gezeigt, daß man das F_V -Fragment des Antikörpers McPC603 als völlig funktionelles und stabiles Protein in *E. coli* herstellen kann. Hierdurch wird die funktionelle Äquivalenz des Transports in das Periplasma der Bakterienzelle zum Transport in das Lumen des endoplasmatischen Retikulums der eukaryotischen Zelle bewiesen. Diese Äquivalenz ist unbekannt und auch unvermutet, da das bisher am besten charakterisierte bakterielle Protein, das als lösliches heterodimeres Protein im Periplasma definiert werden könnte, die *E. coli*-Penicillin-Acylase, durch proteolytische Prozessierung aus einem einzelkettigen Vorläufer im Periplasma entsteht (G. Schumacher, D. Sizmann, H. Hang, P. Buckel

and A. Böck, *Nucleic Acids Res.* 14, 5713 (1986)). Außerdem wurde bereits darauf hingewiesen, daß nach derzeitiger Kenntnis Bakterien keine Enzyme oder Proteine besitzen, die in Eukaryonten an der Faltung beteiligt sein könnten.

Überraschend war auch, daß das F_V -Fragment von McPC603 im wesentlichen die gleiche Affinitätskonstante für Phosphorylcholin hat wie der intakte Antikörper McPC603 selbst. Dieser Befund ist un erwartet, da die Funktionalität von F_V -Fragmenten in der Literatur umstritten ist (J. Sen and S. Beychok, *Proteins* 1, 256 (1986)). Hierdurch zeigt sich, daß eine Modifikation oder sogar komplette Deletion der konstanten Domänen die Funktionalität erhalten kann.

Im Gegensatz zu der bisher einzigen Methode zur Herstellung von F_V -Fragmenten, nämlich durch Proteolyse eines Antikörpers, ergeben sich beim erfindungsgemäßen Verfahren keine Probleme mit nicht-funktionellen, nicht korrekt gefalteten, nicht korrekt reassozierten oder chemisch modifizierten Proteinen. Im übrigen eignet sich das bevorzugte Isolierungsverfahren mit Hilfe eines Antigen- oder Hapten-beladenen Adsorbens auch dazu, solche nach bekannten Verfahren erhaltenen F_V -Fragmente zu reinigen, da solche Verunreinigungen entweder nicht gebunden oder nicht eluiert würden.

Beispiel 1: Herstellung des Plasmids pASK22:

Das Expressionsplasmid pASK22 wird aus dem großen EcoRI-HindIII-Fragment von pUC12 (C. Yanisch-Perron, J. Vieira, and J. Messing, *Gene* 33, 103 (1985)), aus Fragmenten der Vektoren pIII-OmpA1 (Y. Masui, J. Coleman and M. Inouye in "Experimental manipulation of gene expression", M. Inouye, ed., Academic Press 1983) und pH61 (H. Inouye, W. Barnes and J. Beckwith, *J. Bacteriol.* 149, 434 (1982)) sowie verschiedenen synthetischen DNA-Fragmenten in mehreren Stufen mit Hilfe von an sich bekannten Methoden (T. Maniatis, E. F. Fritsch and J. Sambrook, *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor 1982) konstruiert. Die vollständige DNA-Sequenz des so erhaltenen Vektors pASK22 ist in der Tabelle dargestellt.

Mit dem Ligationsgemisch werden kompetente *E. coli*-Zellen transformiert und auf Ampicillinresistenz selektiert. Die Plasmide mit der gewünschten Genstruktur werden durch Restriktionsanalyse sowie Sequenzierung der kritischen Übergänge charakterisiert.

Beispiel 2: Herstellung des F_V -Fragments

Eine Kultur des mit pASK22 transformierten *E. coli*-Stammes W3110 wird in LB-Medium mit 100 mg/l Ampicillin bis zu einer OD_{550} von 0,5 gezüchtet. Durch Zugabe von IPTG bis zu einer Endkonzentration von 1 mM wird die Expression induziert. Nach 45 Minuten werden die Zellen durch Zentrifugieren bei 4000 g (10 Minuten bei 4°C) geerntet. Durch Resuspendieren des Zellpellets in TES-Puffer (0,2 M Tris-HCl, pH 8,0; 0,5 mM EDTA; 0,5 M Saccharose) in 10 ml/l der ursprünglichen Kultur wird eine Zellfraktionierung vorgenommen. Die Zellen werden durch Zugabe von 15 ml/l der ursprünglichen Kultur TES-Puffer, der 1:4 mit Wasser verdünnt ist und 2 mM Phosphorylcholin enthält, einem milden osmotischen Schock ausgesetzt. Nach 30 Minuten Inkubation auf Eis wird die Suspension 10 Minuten bei 5000 g zentrifugiert und der Überstand erneut 15 Minuten bei 48 000 g zentrifugiert. Der so erhaltene Überstand, der alle löslichen periplasmatischen Proteine enthält, wird durch Ultrafiltration (¹⁰AMICON YMS Membran) auf ein Volumen von etwa 2,5 ml/l der ursprünglichen Kultur konzentriert und gegen BBS-Puffer (0,2 M Borat/NaOH, pH 8,0; 0,16 M NaCl) dialysiert. Diese konzentrierte Lösung wird auf eine mit einem Phosphorylcholin-Derivat (B. Chesebro and H. Metzgor, a. a. O.) beladene Affinitätsäule gegeben (1-4 ml Lösung pro ml Bettvolumen), mit BBS-Puffer gewaschen und das reine F_V -Fragment mit einer Lösung von 1 mM Phosphorylcholin in BBS-Puffer eluiert.

Beispiel 3: Gleichgewichtsdialyse

In eine Dialysierkammer mit jeweils 100 µl Volumen auf jeder Seite der Membran wurden auf eine Seite 50 µl gereinigtes F_V -Fragment in BBS-Puffer und auf die andere Seite eine Lösung von 50 µl Phosphoryl-(methyl-¹⁴C) Cholin (50 mCi/mMol) in BBS-Puffer gefüllt. Aus der OD_{295} von 6,85 wurde für das F_V -Fragment eine Konzentration von 0,22 mg/ml ermittelt (R.K. Scopes, *Protein Purification-Principles and Practice*, Springer-Verlag, New York, 1982, S. 241). Nach einer Gleichgewichtseinstellung von 22 Stunden bei Raumtemperatur wurden 20 µl-Proben jeder Lösung in einem Szintillationszähler (Beckman LS 1801) gemessen und die Daten nach Scatchard (a.a.O.) aufgetragen. Aus der Steigung der erhaltenen Linie ergibt

sich eine Affinitätskonstante von $K_a = 1,21 \pm 0,06 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

TABELLE

DNA-Sequenz von pASK22 mit Aminosäure-Sequenzen
von ompA-V_H und phoA-V_L

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

1 GCCTCCAAATACGCAAAACCGCTCTCCCGCGCGTTGGCCGATTCAATTAATGCAGCTGGCA 60
 CGCGGGTTATGCGTTTGGCGGAGAGGGGCGCAACCGCTAAGTAATTACGTGCAGCGT
 61 CGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGCGAGTCAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCT 120
 GCTGTCCAAAGGGCTGACCTTTCGCCCGTCACTGCGCTTGGCTTAATTACACTCAATCGA
 121 CACTCAATTAGGCACCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAAT 180
 GTGAGTAATCCGTGGGTCGGAATGTGAAATACGAAGGCCGAGCATACAACACCTTA
 181 TGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGAATTTCTAGA 240
 ACACCTCGCCTATTGTTAAAGTGTGCTCTTGTGATACTGGTACTAATGCTTAAAGATCT
 241 TAACGAGGGCAAAAATGAAAAAGACAGCTATCGCGATTGCAGTGGCACTGGCTGGTTTC 300
 ATTGCTCCGCTTTTCTTACTTTTCTGTCGATAGCGCTAACGTCACCGTGACCGACCAAG
 MetLysLysThrAlaIleAlaIleAlaValAlaLeuAlaGlyPhe -
 301 GCTACCGTAGCGCAGGCCGAAGTTAAACTGGTAGAGTCTGGTGGTGGTCTGCTACAGCCG 360
 CGATGGCATCGGCTCCGGCTTCAATTTGACCATCTCAGACCACCACGACCATGTCCGC
 AlaThrValAlaGlnAlaGluValLysLeuValGluSerGlyGlyGlyLeuValGlnPro -
 361 GGTGGATCCCTGCGTCTGTCTTGGCTACCTCAGGTTTCACCTTCTCTGACTTCTACATG 420
 CCACCTAGGAGCGCAGACAGAACGCGAGTCCAAAGTGAAGAGACTGAAGATGTAC
 GlyGlySerLeuArgLeuSerCysAlaThrSerGlyPheThrPheSerAspPheTyrMet -
 421 GAGTGGGTACGTGAGCCCCGGGTAAACGCTCGAGTGGATCGCAGTAGCCGTAACAAA 480
 CTCACCCATGAGTCGAGGGGCCATTTGCAGAGCTCACCTAGCGTCGATCGGCATTGTTT
 GluTrpValArgGlnProProGlyLysArgLeuGluTrpIleAlaAlaSerArgAsnLys -
 481 GGTAAACAGTATACCAACCGAATACAGCGCTTCTGTTAAAGGTCGTTTCATCGTTTTCG 540
 CCATTGTTTCAATATGTTGGCTTATGTCGCGAAGACAATTTCCAGCAAAGTAGCAAAGGCA
 GlyAsnLysTyrThrThrGluTyrSerAlaSerValLysGlyArgPheIleValSerArg -
 541 GACACTAGTCAATCGATCCTGTACCTGCAGATGAATGCATTGCGTGTGAAGACACCGCT 600
 CTGTGATCAGTTAGCTAGGACATGGACGCTACTTACGTAACGCACGACTTCTGTGGCGA
 AspThrSerGlnSerIleLeuTyrLeuGlnMetAsnAlaLeuArgAlaGluAspThrAla -

5 601 ATCTACTACTGCGCGCTAACTACTATGGCAGCACTTGGTACTTCGACGTTTGGGGTGCA 560
 TAGATGATGACGCGCGCATTGATGATACCGTCGTGAACCATGAAGCTGCAAAACCCACGT
 IleTyrTyrCysAlaArgAsnTyrTyrGlySerThrTrpTyrPheAspValTrpGlyAla -
 10 661 GGTACCACCGTTACCGTTTCTCTTGATAACATGGAGAAAAATAAGTGAAACAAAGCACT 720
 CCATGGTGGCAATGGCAAAGAAGAACTATTGTACCTCTTTATTTCACTTTGTTCGTGA
 GlyThrThrValThrValSerSerEnd MetLysGlnSerThr -
 15 721 ATTGCACCTGGCACTCTTACCGTTACTGTTTACCCCTGTGACAAAAGCCGATATCGTTATG 780
 TAACGTGACCCGTGAGAATGGCAATGACAAATGGGACACTGTTTTCGGCTATAGCAATAC
 IleAlaLeuAlaLeuLeuProLeuLeuPheThrProValThrLysAlaAspIleValMet -
 20 781 ACCCAGTCTCCGAGCTCTCTGTCTGTATCTGCAGGTGAACGTGTACCAGTGTCTGCAAA 840
 TGGGTCAGAGGCTCGAGAGACAGACATAGACGTCCACTTGCACAAATGGTACAGAACGTTT
 ThrGlnSerProSerSerLeuSerValSerAlaGlyGluArgValThrMetSerCysLys -
 25 841 TCTTCTCAGTCTCTGCTGAACCTCGTAAACCAGAAAACTTCTCGCGTGTATCAGCAA 900
 AGAAGAGTCAGAGACGACTTGAGACCATTGGTCTTTTGAAGGACCGCACCATTAGTCGT
 SerSerGlnSerLeuLeuAsnSerGlyAsnGlnLysAsnPheLeuAlaTrpTyrGlnGln -
 30 901 AAGCCTGCCCAACCGCGAAACTGCTGATCTACGGTGCCTCGACCCGTGAATCTGGTGT 960
 TTCGGACCGGTGGCGGCTTTGACGACTAGATGCCACGCAGCTGGGCACTTAGACCACAA
 LysProGlyGlnProProLysLeuLeuIleTyrGlyAlaSerThrArgGluSerGlyVal -
 35 961 CCGGACCGTTTTACCGGTAGCGGTAGCGGTACCGACTTCACTCTGACCATCTCTCTGTGA 1020
 GGCTTGGCAAAATGGCCATCGCCATCGCCATGGCTGAAGTGAGACTGGTAGAGAAGACAT
 ProAspArgPheThrGlySerGlySerGlyThrAspPheThrLeuThrIleSerSerVal -
 40 1021 CAGGCTGAAGATCTGGCTGTTTACTACTGTCAAAACGACCCTCTTACCGCTGACCTTT 1080
 GTCCGACTTCTAGACCGACAAATGATGACAGTTTGTCTGGTGAGAATGGGCGACTGGAAA
 GlnAlaGluAspLeuAlaValTyrTyrCysGlnAsnAspHisSerTyrProLeuThrPhe -
 45 1081 GGC CGCGCACCAAACTGGAAGTGAAGCGCGCTTGATAAGCTTGGCACTGGCCGCTGTT 1140
 CGCGGGCGGGTTTGACCTTGACTTCGCGGCAACTATTGCAACGTGACCGGCAGCAAA
 GlyAlaGlyThrLysLeuGluLeuLysArgAlaEnd
 50 1141 TACAACGCTGTGACTGGGAAAACCCCTGGCGTTACCCAACTTAATGCCTTGCAGCACATC 1200
 ATGTTGCAGCACTGACCTTTTGGGACCGCAATGGGTGAATTAGCGGAACGTCGTGTAG
 1201 CCCCTTTCGCGAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGT 1260
 GGGGAAAGCGGTGACCCGCAATTATCGCTTCTCGGGCGTGGCTAGCGGGAAGGGTTGTCA

5 1261 TGCAGCGCTGAATGGCGAATGGCGCTGATGCGGTATTTCTCCTTACGCATCTGTGCG 1320
 -----+-----+-----+-----+
 ACGCGTCGGACTTACCGCTTACCGCGGACTACGCCATAAAAGAGGAATGCGTAGACACGC
 10 1321 GTATTTACACCGCATATGGTGCACCTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAA 1380
 -----+-----+-----+-----+
 CATAAAGTGTGGCGTATACCACTGAGAGTCATGTTAGACGAGACTACGGCGTATCAATT
 15 1381 GCCAGCCCCGACACCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGG 1440
 -----+-----+-----+-----+
 CGTTCGGGGTGTGGGCGGTTGTGGGCGACTGCGCGGGACTGCCCCAACAGACGAGGGCC
 20 1441 CATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTGAGAGSTTTTCAC 1500
 -----+-----+-----+-----+
 GTAGGCGAATGTCTGTTTCGACACTGGCAGAGGCCCTCGACGTACACAGTCTCCAAAAGTG
 25 1501 CGTCATCACCGAAACGCGGAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCATTTTATAGGTTA 1560
 -----+-----+-----+-----+
 GCGAGTAGTGGCTTTCGCGCTCTGCTTTCCGGAGCACTATGCGGATAAAAAATATCCAAT
 30 1561 ATGTCTAGATAAATAGTGTCTTCTAGACGTGAGTGGCACTTTTCGGGAAAATGTGCGCG 1620
 -----+-----+-----+-----+
 TACAGTACTATTATTACCAAAGAAATCTGCAGTCCACCGTGAAGAGCCCTTTACACGCGC
 35 1621 GAACCCCTATTGTTTATTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAAT 1680
 -----+-----+-----+-----+
 CTTGGGGATAAACAAATAAAAGATTATGTAGTTTATACATAGGCGAGTACTCTGTTA
 40 1681 AACCCTGATAAATGCTTCAAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATCAACATTTCC 1740
 -----+-----+-----+-----+
 TTGGGACTATTACGAAGTTATTATAACTTTTCCCTTCTACTACTATAAGTTGTAAGG
 45 1741 GTGTGCGCCCTTATCCCTTTTTCGCGCATTTTGCTTCCTGTTTGTCTACCCAGAAA 1800
 -----+-----+-----+-----+
 CACAGCGGGAATAAGGAAAAAACGCCGTAAACGGAAGGACAAAAACAGTGGTCTTT
 50 1801 CGCTGGTGAAGTAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAAC 1860
 -----+-----+-----+-----+
 GCGACCACTTTTCAATTTCTACGACTTCTAGTCAACCCACGTGCTCACCCAAATGAGTGTG
 55 1861 TGGATCTCAACAGCGGTAAAGATCCTTGAGAGTTTTGCGCCCGAAGAACGTTTCCAATGA 1920
 -----+-----+-----+-----+
 ACCTAGAGTTGTGCGCATTTCTAGGAATCTCAAAAGCGGGCTTCTTGCAAAAGGTTACT
 1921 TGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACCCCGGCAAG 1980
 -----+-----+-----+-----+
 ACTCGTGAATAATTTCAAGACGATACACCGCGCCATAATAGGGCATACTGCGGCCCGTTC
 1981 AGCAACTCGGTGCGCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTACCAAGTCA 2040
 -----+-----+-----+-----+
 TCGTTGACCCAGCGCGTATGTGATAAGAGTCTTACTGAACCAACTCATGAGTGTCTAGT

5
 2041 CAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGTGCCATAACCA 2100
 -----+-----+-----+-----+-----+
 GTCCTTTTCGTAGAAATGCCCTACCGTACTGTTCATCTCTTAATACGTCACGACGGTATTGGT

10
 2101 TGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAA 2160
 -----+-----+-----+-----+-----+
 ACTCCTATTGTGACGCGGTTGAATGAAGACTGTTGTAGCCTCCTGGCTTCCTCGATT

15
 2161 CCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACTCGCCCTTGATCGTTGGGAACCGSAGC 2220
 -----+-----+-----+-----+-----+
 GCGGAAAAACGTTGTTACCCCTAGTACATTGAGCGGAAC TAGCAACCCCTTGCCTCG

20
 2221 TGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCCTGAGCAATGGCAACAA 2280
 -----+-----+-----+-----+-----+
 ACTTACTTCGGTATGGTTTGCTGCTCGCACTGTGGTGTCTACGGACATCGTTACCGTTGTT

25
 2281 CGTTGCGCAAATATTAACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGCAACAATTAATAG 2340
 -----+-----+-----+-----+-----+
 GCAACGCGTTTGATAATTGACCGCTTGATGAATGAGATCGAAGGGCCGTTGTTAATTATC

30
 2341 ACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACCTTCTCGCGCTCGGCCCTTCGCGCTGGCT 2400
 -----+-----+-----+-----+-----+
 TGACCTACCTCCGCTATTTCAACGTCCTCGGTGAAGACGCGAGCGGGAAGCGCACCGA

35
 2401 GGTATTGTGATAAAATCTGGAGCCGCTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTCGAGCAC 2460
 -----+-----+-----+-----+-----+
 CCAAATAACGACTATTTAGACCTCGGCCACTCGCACCCAGAGCGCATAGTAACGTCGTG

40
 2461 TGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCGTATCGTAGTTTATCTACACGACGGGAGTCAAGCAA 2520
 -----+-----+-----+-----+-----+
 ACCCGGTCACCAATCGGGAGGCATAGCATCAATAGATGTGCTGCCCTCAGTCCGTT

45
 2521 CTATGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAAGCATTTGGT 2580
 -----+-----+-----+-----+-----+
 GATACCTACTTGCTTTATCTGTCTAGCGACTCTATCCACGGAGTGACTAATTCTGTAACCA

50
 2581 AACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAACTTCATTTTAAAT 2640
 -----+-----+-----+-----+-----+
 TTGACAGTCTGGTTCAATGAGTATATATGAATCTAACTAAATTTTGAAGTAAAAATTA

55
 2641 TTAAGAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTGTATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTG 2700
 -----+-----+-----+-----+-----+
 AATTTTCCTAGATCCACTTCTAGGAAAAACTATTAGAGTACTGGTTTATAGGAATTGCAC

2701 AGTTTTCGTTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATC 2760
 -----+-----+-----+-----+-----+
 TCAAAAGCAAGGTGACTCGCAGTCTGGGGCATCTTTTCTAGTTTCTAGAAGAACTCTAG

2761 CTTTTTTCTCGCGGTAACTGCTGCTGTGCAAAACAAAAAACCCGCTACCAGCGGTGG 2820
 -----+-----+-----+-----+-----+
 GAAAAAAGACGCGCATTAGACGACGAACGTTGTTTTTTTGTGGCGATGGTCCCAAC

5
 2821 TTGTTTGGCCGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCGAAAGTAACTGGCTTCAGCAGAG 2880
 -----+-----+-----+-----+-----+
 AAACAAACGGCCTAGTTCTCGATGGTTGAGAAAAAGGCTCCATTGACCGAAGTCGTCCTC
 10
 2881 CGCAGATACCAAATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACCTTCAAGAACT 2940
 -----+-----+-----+-----+-----+
 GCGCTATATGGTTTATGACAGGAAGATCACATCGGCATCAATCCGGTGGTGAAGTCTTGA
 15
 2941 CTGTAGCACCGCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTG 3000
 -----+-----+-----+-----+-----+
 GACATCGTGGCGGATGTATGGAGCGAGACGATTAGGACAATGGTCACCGACGACGGTCAC
 20
 3001 GCGATAAGTCGTGCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCCGAGC 3060
 -----+-----+-----+-----+-----+
 CGCTATTACGACACAGAATGGCCCAACCTGAGTTCGTCTATCAATGGCTATTCCGCGTCG
 25
 3061 GGTGGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACGCCAGCTTGGAGCAACGACCTACACCG 3120
 -----+-----+-----+-----+-----+
 CCAGCCGACTTGCCCCCAAGCACGTGTCTGGGTGCAACCTCGCTTGTCTGGATGTGGC
 30
 3121 AACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCAGCTTCCGAAGGGAGAAAGG 3180
 -----+-----+-----+-----+-----+
 TTGACTCTATGGATGTGCACTCGATACCTTTTCGGGTGCGAAGGGCTTCCCTCTTTCC
 35
 3181 CGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAG 3240
 -----+-----+-----+-----+-----+
 GCCTGTCCATAGGCCATTGCGCGTCCGAGCCTTGTCTCTCGCGTGTCTCCCTCGAAGGTC
 40
 3241 GGGGAAACGCCCTGGTATCTTTATAGTCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTC 3300
 -----+-----+-----+-----+-----+
 CCCCTTTGCGGACCATAGAAATATCAGGACAGCCCAAAGCGGTGGAGACTGAACCTCGCAG
 45
 3301 GATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGGGAGCGCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCT 3360
 -----+-----+-----+-----+-----+
 CTAAAAACACTACGAGCAGTCCCCCGCCTCGGATACCTTTTGGGTGCTTGGCGCGGA
 50
 3361 TTTTACGGTCTCGGCCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTTCCTGCGTTATCCC 3420
 -----+-----+-----+-----+-----+
 AAAATGCCAAGGACCGGAAACGACCGGAAACGAGTGACAGAAAGGACGCAATAGGG
 55
 3421 CTGATCTCTGGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCGCGACGC 3480
 -----+-----+-----+-----+-----+
 GACTAAGACACCTATTGGCATAATGGCGAAACTCACTGCACTATGGCGAGCGGCGTCGG
 60
 3481 GAACGACCGAGCCGACCGACTCAGTGACGAGGAAGCGGAAG 3523
 -----+-----+-----+-----+-----+
 CTTGCTCGCTCGCGTCGCTCAGTCACTCGCTCTCTCGCCTTCT

Ansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von funktionellen Antikörpern, funktionellen Fragmenten von Antikörpern oder Fusionsproteinen aus Antikörperdomänen und anderen Proteinen, dadurch gekennzeichnet, daß man die Gene für die einzelnen Ketten an je eine Signalsequenz koppelt, die den Transport der Polypeptidketten durch die cytoplasmatische Membran einer Bakterienzelle bewirken und dann abgespalten werden, die Genstrukturen in einem Bakterium zur Expression bringt und das funktionelle Protein aus dem periplasmatischen Raum oder dem Medium, isoliert.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Bakterium ein Gram-negatives Bakterium ist.

3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Bakterium *E. coli* ist.

4. Verfahren nach Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß man die Gene für die beiden Präpeptide in der Form eines regulierbaren Operon-Systems koppelt.

5. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man zur Isolierung des funktionellen Proteins aus dem periplasmatischen Raum die abgetrennten Bakterien einem solchen osmotischen Schock aussetzt, daß das Periplasma austritt, das Cytoplasma aber intakt bleibt, die hierbei erhaltene flüssige Phase durch Zentrifugieren anreichert und aus diesem Konzentrat die gewünschten Proteine gewinnt.

6. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man die das funktionelle Protein enthaltende Lösung auf ein mit dem entsprechenden Antigen oder Hapten beladenes Adsorbens gibt und die gewünschten Proteine durch Elution mit einer dieses Antigen oder Hapten enthaltenden Lösung isoliert.



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung

EP 88 12 1675

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl.3)
X	EP-A-0 234 592 (TEIJIN LIMITED) * Zusammenfassung; Seite 3, Zeile 15 - Seite 5, Zeile 3; Seite 5, Zeile 31 - Seite 6, Zeile 15; Seite 13, Beispiel C; Seite 16, Zeile 27 - Seite 17, Zeile 11; Seite 41, Beispiel 18; Seite 44, Beispiel 20; Ansprüche 1,7,9,10,23,24 *	1-6	C 12 N 15/00 C 12 P 21/00
Y	EP-A-0 196 864 (CETUS CORPORATION) * Zusammenfassung; Seite 3, Zeile 21 - Seite 4, Zeile 13; Seite 5, Zeile 28 - Seite 6, Zeile 14; Ansprüche 1-2,11 *	1-4	
D,Y	PROC. NATL. ACAD. SCI. USA Band 81, Juni 1984, Seiten 3273-3277, Washington, US; S. CABILLY et al.: "Generation of antibody activity from immunoglobulin polypeptide chains produced in Escherichia coli". * Zusammenfassung, Figur 2, Seite 3274, Spalte 1 *	1-4	
P,X	CHEMICAL ABSTRACTS Band 109, Nr. 3, 18. Juli 1988, Zusammenfassung Nr. 21334w; MARC BETTER et al.: "Escherichia coli secretion of an active chimeric antibody fragment"; & SCIENCE 1988, Band 240, Nr. 4855, Seiten 1041-1043	1-3	C 12 N 15/00 C 12 P 21/00
P,X	BIOSIS DATABASE Zusammenfassung Nr. 85099940; K. KITAI et al.: "Extracellular production of human immunoglobulin G FC region H-IGG-FC by escherichia-coli"; & APPL. MICROBIOL. BIOTECHNOL., Band 28, Nr. 1, 1988, Seiten 52-56	1-3	
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort BERLIN		Abschlußdatum der Recherche 21-03-1989	
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE		Prüfer JULIA P.	
X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur		T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument	



EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl.3)
P,X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN Band 12, Nr. 56 (C-477), 19. Februar 1988; & JP - A - 62 201 581 (RIKAGAKU KENKYUSHO) 5. September 1987 ---	1-4	
A	EP-A-0 120 694 (CELLTECH LIMITED) * Zusammenfassung; Seite 2, Zeilen 14-28, Seite 7; Zeile 15 - Seite 8, Zeile 28, Seite 10, Zeilen 30-35; Seite 12, Zeilen 12-15; Seite 35, Zeile 30 - Seite 37, Zeile 5; Ansprüche *	1-4	
A	CHEMICAL ABSTRACTS Band 101, Nr. 9, 27. August 1984, Zusammenfassung Nr. 67017h; ORNA ZEMEL-DREASEN et al.: "Secretion and processing of an immunoglobulin light chain in Escherichia coli"; & GENE, 1984, Band 27, Nr. 3, Seiten 315-322 -----	1-4	
			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl.3)
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort BERLIN		Abschlußdatum der Recherche 21-03-1989	Prüfer JULIA P.
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE			
X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentedokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument			